Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

REDUZIERTES GLUTATHION (GSH) UND ENZYMAKTIVITÄTEN IN ERYTHROZYTEN VERSCHIEDENEN ALTERS BEI CHRONISCHER MYELOSE UND OSTEOMYELO (FIBRO) SKLEROSE

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rudolf Kraft
aus Groß–Ottersleben

1977

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

REDUZIERTES GLUTATHION (GSH) UND ENZYMAKTIVITÄTEN IN ERYTHROZYTEN VERSCHIEDENEN ALTERS BEI CHRONISCHER MYELOSE UND OSTEOMYELO (FIBRO) SKLEROSE

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rudolf Kraft
aus Groß–Ottersleben

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. R. Lempp

Berichterstatter: Professor Dr. H. Chr. Benöhr
(Professor Dr. H. D. Waller)

FOTO - SCHNELLDRUCK Hans - Joachim Köhler - 74 Tübingen - Neue Strasse 11

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
- EINLEITUNG		1
- ABKÜRZUNGEN		5
- METHODIK		6
I.)	Gewinnung des Blutes und Isolierung der Erythrozyten	6
II.)	Herstellung der Lösungen zur Differentialzentrifugation	6
	1a.) Kochsalz-Glukose-Puffer	6
	1b.) Albuminstammlösung	6
	2 .) Albumindichtegradienten	8
III.)	Gradientenzentrifugation	8
IV.)	Herstellung der Hämolysate	9
V.)	Hämoglobinbestimmung	9
VI.)	GSH-Bestimmung	9
VII.)	Bestimmung der Enzymaktivitäten	10
	1.) Glutathion-Reduktase	10
	2.) Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	10
	3.) 6-Phospho-Glukonat-Dehydrogenase	11
	4.) Pyruvat-Kinase	11
VIII.)	Berechnung der Enzymaktivitäten	11
- ERGEBNISSE		14
- TABELLEN und ABBILDUNGEN		17
- DISKUSSION		28
- ZUSAMMENFASSUNG		34
- LITERATURVERZEICHNIS		35

EINLEITUNG

Der menschliche Erythrozyt verliert im Laufe seiner Reifung vom Erythroblasten über den Normoblasten bis zur ausgereiften Zelle Kern, Mitochondrien und Ribosomen. Parallel mit dem Verlust der Zellorganellen büßt die Zelle einen großen Teil ihrer Stoffwechselleitungen ein. Der reife Erythrozyt besitzt als intakte Stoffwechselwege nur noch die anaerobe Glykolyse und den Hexosemonophosphatzyklus, und deckt mit ihrer Hilfe seinen Energiebedarf (56). Gegenüber den kernhaltigen Vorstufen sind im Retikulozyten und Erythrozyten die Aktivitäten von Enzymen der Glykolyse und des Hexosemonophosphatzyklus deutlich vermindert (52).

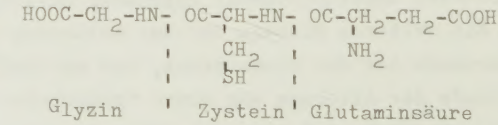
Der ausgereifte Erythrozyt hat eine Lebensdauer von 120 ± 15 Tagen (88). In diesem Zeitraum macht er eine Alterung durch, die ebenfalls mit wesentlichen biochemischen und morphologischen Änderungen verbunden ist. Zu den biochemischen Veränderungen gehören Aktivitätsverluste der meisten intrazellulären Enzyme, von denen die Hexokinase (17,38,89), die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (17,61,75,89), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (61,89), Fruktose-6-Phosphokinase (89) und Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (54,55,89) besonders stark betroffen sind. Außderdem findet man eine Abnahme des reduzierten Glutathions (33,89), der Nukleotide AMP, ADP, ATP, NAD, NADP, GDP, GTP und IMP (33,55,75) sowie des intrazellulären Phosphatesters 2,3-Diphosphoglyzerat (12). Die Abnahme der energiereichen Phosphate hat wesentliche Folgen. Die Funktionsfähigkeit der Kationenpumpe ist gestört, sodaß ein erhöhter Einstrom von Na^+ (12) und ein intrazellulärer Verlust von K^+, Ca^{++}, und Mg^{++} resultiert (12,52,85). Infolge dieser Veränderungen, wahrscheinlich auch durch einen geringeren Phosphatidgehalt der Membranen (30,72), kommt es zur Verminderung der mechanischen und osmotischen Resistenz (80), und infolge eines erniedrigten GSH/GSSG-Quotienten zur erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxydierenden Substanzen (49). Ein weiterer Hinweis für das Auftreten morphologischer Veränderungen ist die Beobachtung, daß die Erythrozytenmembran im Laufe der Alterung von einer "granulated membrane" in eine "smooth membrane" übergeht (27). Veränderungen

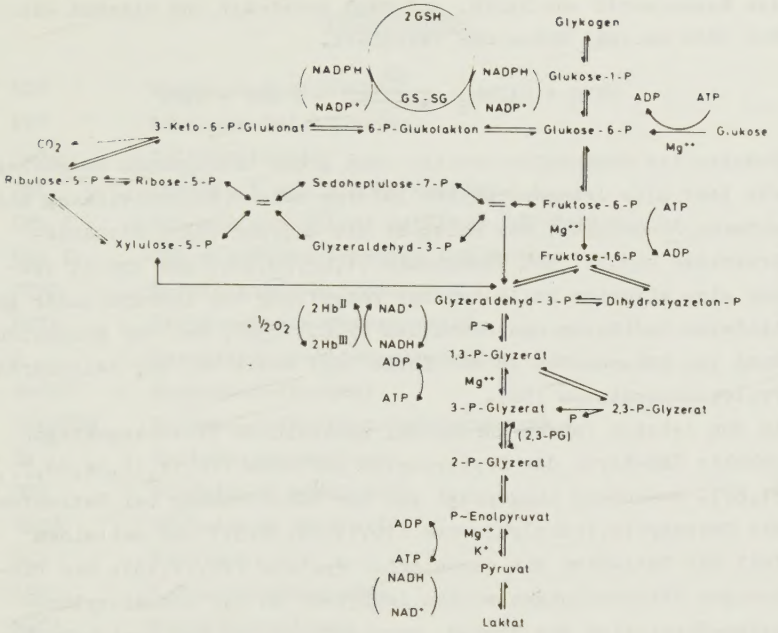
am Hämoglobin werden infolge der verminderten Methämoglobinreduktion (73), durch erhöhten Methämoglobingehalt (18,92), durch verminderte Affinität zu Sauerstoff (29) und Chrom (44) sowie durch Auftreten elektrophorethisch schneller wandernder Hämoglobinfraktionen deutlich (42,43). Mit zunehmendem Alter verkleinert sich die Zelle, wird spezifisch dichter (71), verliert die bikonkave Scheibenform infolge verminderter ATP-Bildung (46,65,89), geht in eine sphärozytäre Form über und wird im RES sequestriert.

Der zentrale Energieträger des Erythrozyten ist ATP (21). Die reife rote Zelle bildet das ATP fast ausschließlich durch die Glykolyse, während der Retikulozyt ATP überwiegend über die Atmungskette gewinnt.

Durch Vergärung von einem Mol Glukose werden unter Bereitstellung von zwei Mol ATP zwei Mol Laktat gebildet. ATP wird benötigt für die Phosphorylierung der Glukose und des Fruktose-6-Phosphates, zwei enzymatischen Schritten der Glykolyse, die durch die Hexokinase und Phosphofruktokinase katalysiert werden. ATP wird ferner benötigt für die Synthese zahlreicher zellulärer Verbindungen und für die Aufrechterhaltung des Kationengleichgewichts. Gegenüber anderen lebenden Zellen besitzt die Glykolyse des Erythrozyten zwei Besonderheiten, die für die Funktion des Hämoglobins von Bedeutung sind. Es handelt sich dabei um die NADH-gebundene enzymatische Reduktion von Methämoglobin und um die Bereitstellung von 2,3-Diphosphoglyzerat, das durch Bindung an Desoxyhämoglobin die Sauerstoffaffinität erhöht. Das durch die Hexokinasereaktion gebildete Glukose-6-Phosphat wird zu etwa 5-10% über den Hexosemonophosphatzyklus metabolisiert. In den Enzymreaktionen der G-6-PDH und 6-P-GDH wird $NADP^+$ zu NADPH reduziert, das zur Reduktion des intrazellulären GSSG benötigt wird (16).

Reduziertes Glutathion ist ein Tripeptid, bestehend aus den Aminosäuren Glyzin, Zystein und Glutaminsäure, das als Besonderheit eine γ-Glutamylbindung mit dem Zystein besitzt(70).





Schema der Glykolyse, des Hexose-monophosphatzyklus und der Glutathion- und Methämoglobin-reduzierenden Reaktionen in Erythrozyten.

Die ausschließlich intrazellulär erfolgende Biosynthese des GSH (83) erfolgt in zwei ATP-verbrauchenden enzymatischen Schritten:
1.) Glutaminsäure und Zystein werden unter Verbrauch von einem Mol ATP durch die γ-Glutamyl-Zystein-Synthetase verbunden.
2.) Aus dem entstehenden γ-Glutamyl-Zystein wird im zweiten Reaktionsschritt durch die Glutathion-Synthetase, die wahrscheinlich das Steuerenzym dieser Reaktionskette ist (95), unter Verbrauch eines zweiten Moles ATP das GSH gebildet. Durch reversible Oxydation der SH-Gruppen zweier GSH-Moleküle entsteht das über eine Disulfidbrücke verbundene Doppelmolekül GSSG.
GSH und GSSG bilden in der Zelle ein wichtiges Redoxsystem, das in den Erythrozyten des Menschen zu über 99% in reduzierter Form vorliegt (83,93). Die Reduktion des GSSG wird durch das Flavoenzym Glutathion-Reduktase katalysiert (7,58,63,78), das

den Wasserstoff von $NADPH_2$ auf GSSG überträgt und hierbei ein Mol GSSG zu zwei Molen GSH reduziert.

$$GSSG + NADPH_2 \xrightleftharpoons{GR} 2\ GSH + NADP^+$$

Reduziertes Glutathion besitzt eine große biologische Bedeutung für fast alle lebenden Zellen infolge seiner Wechselwirkung mit anderen SH-Gruppen, zum Beispiel mit Enzymen (78), Strukturproteinen (45,74) und Hämoglobin (1,42,79,91). GSH spielt ferner eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von intrazellulär gebildeten Radikalen und Peroxyden (2,6,31,32), bei der Einschleusung von Aminosäuren in die Zelle (62) sowie bei der zellulären Proteinbiosynthese (50).

In den letzten Jahren wurden bei zahlreichen Bluterkrankungen erhöhte GSH-Werte der Erythrozyten gefunden (10,11,15,36,68,77, 81,87). Besonders ausgeprägt war die GSH-Erhöhung bei Patienten mit Osteomyelo(fibro)sklerose (10,11,15,36,81) und bei einem Teil der Patienten mit chronischer Myelose (10,11,15). Die bisherigen Untersuchungen wurden lediglich an der Gesamterythrozyten-Population des Blutes durchgeführt. Da das periphere Blut des Menschen Erythrozyten verschiedenen Alters enthält, ist eine nähere Aussage über GSH-Gehalt und Enzymaktivitäten in Fraktionen verschiedenen Alters wünschenswert, um zu klären, ob eine Parallelität von GSH-Gehalt und Enzymaktivitäten in Erythrozyten verschiedenen Alters nachzuweisen ist und ob Veränderungen in einer der Fraktionen besonders stark ausgeprägt sind.

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Erythrozyten verschiedenen Alters mittels der Albumin-Dichtegradienten-Zentrifugation aufzutrennen und anschliessend den GSH-Gehalt sowie die Enzymaktivitäten der Glutathionreduktion (GR, G-6-PDH, 6-P-GDH) und der Glykolyse (PK) zu bestimmen.

Gleichzeitig sollte die Arbeit näheren Aufschluß darüber bringen ob bei den untersuchten Patienten eine Beziehung zwischen biochemischen Veränderungen der Erythrozyten und klinischen Parametern herzustellen ist.

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosin-5-diphosphat
ATP	Adenosin-5-triphosphat
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CML	chronisch myeloische Leukämie
CML I	CML mit nur leicht erhöhten GSH-Werten
CML II	CML mit stark erhöhten GSH-Werten
DTNB	Dithio-bis-p-nitrobenzoat
EDTA	Äthylendiamin-Tetra-Acetat
G	Gesamterythrozytensuspension
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxydiert
KCl	Kaliumchlorid
LDH	Laktatdehydrogenase
$MgCl_2$	Magnesiumchlirid
NaCl	Natriumchlorid
Na_2CO_3	Natriumbikarbonat
$NADH_2$	Nikotinsäureamid-Dinuklotid reduziert
NADP	Nikotinsäureamid-Dinkleotid-Phosphat oxydiert
$NADPH_2$	Nikotinsäureamid-Dinukleotid-Phosphat reduziert
Na_2HPO_4	sec. Natriumphosphat
OMF	Osteomyelofibrose
OMS	Osteomyelosklerose
PEP	Phosphoenolpyruvat
6-P-G	6-Phosphoglukonat
6-P-GDH	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase
TRAP	Triäthanolamin-Pufferlösung
I	junge Erythrozytenpopulation
II	mittlere Erythrozytenpopulation
III	alte Erythrozytenpopulation

METHODIK

I. Gewinnung des Blutes und Isolierung der Erythrozyten mod. nach BUSCH und PELZ (22)

Nach Entnahme von 10 ml venösem Blut aus der gestauten Armvene mit einer V_2A-Kanüle (Ø 1,1mm) in 3,8% Natriumzitratlösung im Verhältnis 10:1 wurden auf einer 50cm langen, am Boden mit Baumwolle gestopften Glassäule mit Hahn die Erythrozyten eluiert. - Dazu wurde zunächst ungebleichte, käufliche Topflappenbaumwolle 30 min. in Seifenlösung gekocht, dann mit Wasser nachgespült und nach mehrfacher Spülung mit aqua dest. bei ca. 50°C im Autoklaven getrocknet. - Mit 2,6g dieser Baumwolle wurde der Boden der Glassäule gestopft und anschließend mit ca. 100ml 0,15 molarer KCl-Lösung äquilibriert. Dann wurde das Blut aufgetragen und anschließend mit 10ml 0,15 molarer KCl-Lösung nachgespült. Bei Verwendung von größerem Volumina Spülflüssigkeit werden vermehrt Leukozyten ausgewaschen. Die im Eluat gewonnen Erythrozyten wurden 5 min. bei 3000 rpm zentrifugiert und zweimal in gepufferter Kochsalz-Glukose-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Suspension mit Kochsalz-Glukose-Puffer-Lösung auf eine physiologische Hämogloginkonzentration eingestellt.

II. Herstellung der Lösungen zur Differentialzentrifugation mod. nach PIOMELLI (71)

1a.) gepufferte Kochsalz-Glukose-Lösung:
In 1000ml Aqua bidest. wurden 2g Glukose; 1,38g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ und 7,5g NaCl gelöst, das pH mit 0,1N NaOH auf 7,36 und die Osmolarität mit Hilfe von NaCl auf 290±1 mOsmol pro Liter eingestellt. Anschließend endgültige Einstellung des pH auf 7,4.

1b.) Albuminstammlösung:
200g pulverisiertes Rinderserumalbumin (Pentex; Fraction V.; der Firma Miles Labratories, Inc. Kankakee) wurden in einem 2 Liter Kunststoffgefäß mit 380ml pyrogenfreiem Aqua bidest. unter ständigem Rühren mit dem magneti-

schen Rührstab im Kühlraum zur Lösung gebracht. Nach etwa 24 Stunden wurden der Lösung für weitere 24 Stunden 100g Amberlite MB3 zugesetzt. Anschließend 10 Minuten Zentrifugation der Lösung in 500ml Metallbechern in einer großen Stock-Zentrifuge (Fa. Stock; Marburg/L.) bei 3000g und 4°C. Der Überstand wurde abgegossen und nochmals mit 50g Amberlite MB3 versetzt und weitere 2 Stunden bei 4°C gerührt. Danach 2 Stunden lang Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge bei 20000 rpm, anschließend Auffangen des Überstandes durch eine fünffache Gazeschicht in ein tariertes Gefäß. Das in der Lösung enthaltene Wasser wird nach der Formel:

$$H_2O_a = V - (0{,}73 \cdot c_a \cdot V)$$

bestimmt, wobei H_2O_a dem in der Lösung enthaltenen Wasser, V dem weiter unten berechneten Volumen, c_a der Albuminkonzentration in g/ml und 0,73 der Volumeneinheit entspricht, die von einem Gramm gelösten Albumins eingenommen wird.
Für das Volumen gilt folgende Beziehung:

$$V = \frac{G}{1 + (0{,}0027 \cdot c)}$$

wobei G das Gesamtgewicht der Lösung und c die Albuminkonzentration in g/100ml ist.
Diese Konzentration wurde in einer 1:1000 verdünnten Stammlösung mit der Biuretmethode bestimmt. Je 100ml des in der Stammlösung enthaltenen Wassers wurden der Lösung folgende Substanzen zugesetzt:

116 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
127 mg KCl
484 mg Na_2CO_3
61 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
200 mg Glukose

Nach Zugabe von Salzen und Glukose wurde die Osmolarität mit NaCl auf 290±1 mOsmol/l eingestellt. Die Bestimmung des spezifischen Gewichts erfolgte in kalibrierten 100ml Meßkolben bei 20°C.

2.) Herstellung der Albumindichtegradienten:
Durch Mischung der Albuminstammlösung mit Kochsalz-Glukose-Puffer wurden Verdünnungen verschiedenen spezifischen Gewichts hergestellt. Zur Verwendung gelangten solche mit einem spezifischen Gewicht von 1,086 g/cm^3 bei 20°C. Korrigiert man diese Werte nach LEIF und VINOGRAD (51) mit dem entsprechenden Ausdehnungskoeffizienten, in diesem Fall $2,7 \cdot 10^4$ $g/cm^{-3}/°C$, so erhält man entsprechende Werte für das spezifische Gewicht bei 4°C von 1,091 g/cm^3 und 1,093 g/cm^3.
Diese Gradienten wurden in Tagesportionen von 5ml in weichen Kunststoffröhrchen bei -25°C eingefroren.

III. Gradientenzentrifugation:

In Nitrozelluloseröhrchen (1/2 . 2 inches) erfolgte der Aufbau der diskontinuierlichen Gradienten durch Unterschichten von 1,5ml der spezifisch leichteren mit 1,5ml der spezifisch schwereren Albuminlösung im Eisbad bei 4°C. Dabei wurde mit einer plangeschliffenen 1,0 Blutentnahmekanüle möglichst gradlinig die leichtere Fraktion durchstochen und aus einer aufgesetzten 2ml Einmalspritze durch möglichst vorsichtiges und gleichmäßiges Betätigen des Kolbens die spezifisch schwerere Albuminlösung am Boden des Röhrchens aufgetragen. Darauf wurden 0,1ml der gepufferten Glukose-Kochsalz-Lösung und anschließend 0,4 bis 0,5ml der Erythrozytensuspension darübergeschichtet. Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation im Swing Rotor SW 39 der Ultrazentrifuge (Spinco L der Firma Beckman) bei 20000 rpm und 4°C erfolgte durch sorgfältiges Abheben mit einer Pasteur-Pipette die Gewinnung der Erythrozyten verschiedener Dichte und somit verschiedenen Alters. Dabei waren die jüngsten Zellen leichter als 1,086 g/cm^3 bei 20°C und fanden sich in der obersten albuminfreien Schicht. Die beiden Albuminschichten enthielten die beiden anderen Altersfraktionen, wobei zwischen den Albumingradienten die Erythrozyten mit einem spezifischen Gewicht von 1,086 bis 1,088 g/cm^3 lagen und sich die ältesten Zellen mit einem spezifischen Gewicht über 1,088 g/cm^3 am Boden des Zentrifugenröhrchens befanden.

Anschließend wurden durch erneute zweimalige Waschung und fünfminütige Zentrifugation mit Kochsalz-Glukose-Puffer-Lösung die Rückstände der Albuminlösung entfernt.

IV. Herstellung der Hämolysate nach LÖHR und WALLER (53):

0,1ml mit Kochsalz-Glukose-Puffer auf einen physiologischen HK-Wert verdünnter Erythrozytensuspension wurden mit

0,1ml Aqua dest.
0,07ml 0,1M TRAP pH 7,5 und
0,03ml gesättigter Digitoninlösung versetzt.

Hämolyse während 15 Minuten im Eisbad. Abtrennung ungelöster Teile durch vierminütige Zentrifugation bei 3200 rpm.

V. Hämoglobinbestimmung nach DRABKIN und AUSTIN (28):

Grundlage dieser Methode ist die Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin mit Kaliumferrizyanid und die anschließende Bildung des sehr stabilen Cyanomethämoglobinkomplexes. Für die Untersuchung wurde eine Lösung mit 1g Natriumhydrogenkarbonat, 0,2g Kaliumferrizyanid und 0,05g Kaliumzyanid in 1000ml Aqua dest. verwendet. 5ml dieser Lösung wurden mit 0,02ml der Erythrozytensuspension durchmischt. Nach 20 Minuten Extinktionsmessung der Cyanomethämoglobin-Lösung in einer 10mm-Küvette mit Filter Hg 546nm im Eppendorf-Photometer gegen hämoglobinfreie Lösung. Umrechnungsfaktor: 38.

VI. GSH-Bestimmung nach BEUTLER et al. (13):

Grundlage dieser Methode ist die Farbkomplexbildung zwischen SH-Gruppen und Dithio-bis-nitrobenzoat (DTNB). Der Komplex ist etwa 30 Minuten weitgehend temperaturunabhängig und stabil. 0,05ml der Erythrozytensuspension wurden in 0,15ml Aqua bidest. hämolysiert. Enteiweißung unter Schütteln mit 0,3ml einer Lösung, die 1,67g Metaphosphorsäure (glaciale), 0,2g EDTA und 30g NaCl auf 100ml Aqua bidest. enthielt. 5 Minuten stehenlassen und anschließend zentrifugieren.

Testansatz: 0,2ml Filtrat
0,8ml Na_2HPO_4 (0,3M)
0,1ml DTNB (40mg in 100ml 1%iger Natriumzitratlösung)

Leerwert: Gleicher Ansatz mit 0,2ml Filtrat aus 0,3ml Metaphosphorsäure (Lösung wie oben) und 0,2ml Aqua bidest.

Gut durchmischen. Messung innerhalb der ersten 5 Minuten nach DTNB-Zugabe bei 405 nm und Schichtdicke 10mm im Eppendorf-Photometer gegen den Leerwert.
Molarer Extinktionskoeffizient: 13400.
Angabe des GSH-Gehalts in µmol/gHb.

VII. Bestimmung der Enzymaktivitäten:

Die Aktivitäten der an der Glutathionreduktion beteiligten Enzyme Glutathion-Reduktase, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phospho-Glukonat-Dehydrogenase sowie des glykolytischen Enzyms Pyruvatkinase wurden mit den oben gewonnenen Hämolysaten im optischen Test bestimmt. Angabe aller Enzymaktivitäten in IU/gHb.

1.) Glutathion-Reduktase-Bestimmung nach WALLER (90):

Reaktionsschema: $GSSG + NADPH_2 \xrightleftharpoons{GR} 2\ GSH + NADP^+$

Testansatz: 1,375ml TRAP (0,1M, pH 7,5)
0,05ml Hämolysat
0,05ml $NADPH_2$ (10 mg/ml Aqua bidest.)
2 Minuten warten!
0,025 ml GSSG (50 mg/ml Aqua bidest., mit NaOH neutralisiert)

Starten des Direktschreibers.

2.) Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Bestimmung: nach LÖHR und WALLER (53):

Reaktionsschema: $G\text{-}6\text{-}P + NADP \xrightleftharpoons{G\text{-}6\text{-}PDH} 6\text{-}P\text{-}G + NADPH_2$

Testansatz: 1,375ml TRAP (0,1M, pH 7,5)
0,05ml Hämolysat

0,05ml NADP (25 mg/ml Aqua bidest.)
5 Minuten warten!
0,025ml G-6-P (30 mg/ml Aqua bidest.)
Starten des Direktschreibers.

3.) 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase-Bestimmung nach HORECKER und SMYRNIOTIS (40):

Reaktionsschema: 6-P-G + NADP $\xrightleftharpoons{\text{6-P-GDH}}$ 3-Keto-Glukonat + $NADPH_2$

Testansatz: 1,375ml TRAP (0,1M, pH 7,5)
0,05ml Hämolysat
0,05ml NADP (25 mg/ml Aqua bidest.)
5 Minuten warten!
0,025ml 6-P-G (30 mg/ml Aqua bidest.)
Starten des Direktschreibers.

4.) Pyruvatkinasebestimmung nach BEISENHERZ et al. (5):

Reaktionsschema:

P-Enolpyruvat + ADP $\xrightleftharpoons{Mg^{++},K^{+}}$ ATP + Pyruvat

Pyruvat + $NADPH_2$ $\xrightleftharpoons{\text{PK}}$ Laktat + NAD

Testansatz: 0,84ml TRAP (0,1M, pH 7,5)
0,075ml 0,5M $MgSO_4$. 2M KCl
0,025ml Hämolysat
0,01ml DPNH (10 mg/ml Aqua bidest.)
0,02ml LDH
0,05ml ADP (15 mg/ml Aqua bidest.)
0,05ml PEP (15 mg/ml Aqua bidest.)
Starten des Direktschreibers.

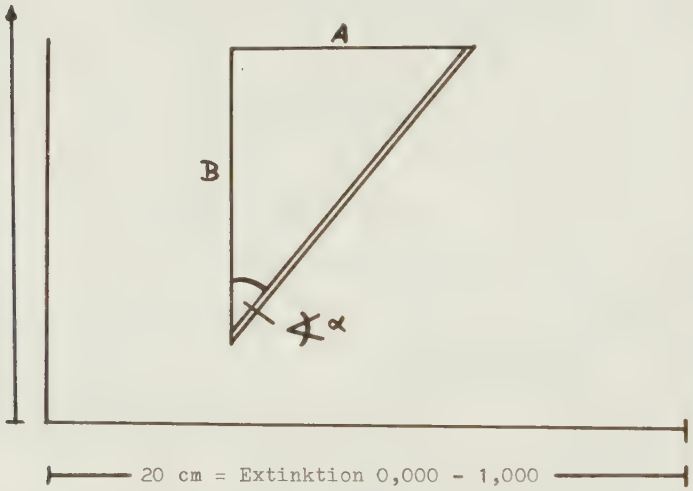
VIII. Berechnung der Enzymaktivitäten:

a.) Gerätekonstanten:
Eppendorf-Photometer mit Direktschreiber, Extinktionsbereich auf 0,000 bis 1,000 geschaltet. Küvettenschichtdicke = 10mm. Filter = 366nm. Temperatur = 25°C. Papiervorschub des Direktschreibers = 0,5 cm/min.

b.) Faktorberechnung:

Papiervorschub = 0,5 cm/min. Papierbreite = 20 cm bei einem Extinktionsbereich von 0,000 bix 1,000. Molarer Extinktionskoeffizient von $NADH_2$ und $NADPH_2$ bei 366 nm = $3,3 \cdot 10^6$

Papiervorschub = 20 cm/min.



$\tan\alpha = \frac{A}{B}$; $A = B \cdot \tan\alpha$; $B = 0,5$ cm/min

$\frac{A\ (cm)}{E} = \frac{20}{1,000}$; $E = \frac{A \cdot 1,000}{20}$;

Enzymaktivität = $E \cdot$ Verdünnung $\cdot \frac{100}{gHb} \cdot \frac{1}{\text{Ext. Koeff.}}$

$= \frac{A \cdot 1,000}{20} \cdot$ Verdünnung $\cdot \frac{100}{gHb} \cdot \frac{1}{3,3 \cdot 10^6}$

$= \frac{0,5 \cdot \tan\alpha \cdot 100 \cdot \text{Verdünnung}}{20 \cdot 3,3 \cdot 10^6 \cdot gHb}$

E = Extinktion

Ext. Koeff. = molarer Extinktionskoeffizient = $3,3 \cdot 10^6$

g = Gramm

Bei den Enzymen der Glutathionreduktion (GR, G-6-PDH und 6-P-GDH) ergibt sich ein Umrechnungsfaktor von 68,4; bei der Pyruvatkinase (PK) ein Umrechnungsfaktor von 93,0. Die Einheit der Enzymaktivität ist:

µmol Substratumsatz/ min/gHb
= IU/gHb

ERGEBNISSE

Die vorliegenden Befunde wurden durch Untersuchungen von 14 Normalpersonen, 20 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) und 11 Patienten mit Osteomyelo(fibro)sklerose (OMS/OMF) gewonnen. Das normale Probandenkollektiv setzte sich aus Studenten, Ärzten, Laboranten und einem Patienten mit Herzinfarkt zusammen, bei denen sich die Untersuchungen des Blutbildes als normal erwiesen hatten. Bei den Patienten mit CML wurde die Diagnose durch klinischen Befund, Untersuchung des Blutbildes, der alkalischen Leukozytenphosphatase und des Knochenmarks, sowie durch Nachweis des Philadelphia-Chromosoms gesichert. Bei allen Patienten war eine Milzbestrahlung vorausgegangen, zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden 12 Patienten mit Busulfan (Myleran^{R}) behandelt. Bei den Patienten mit OMS/OMF wurde die Diagnose durch klinischen Befund, Beckenkammstanze und Knochenmarksuntersuchung gestellt.

Die Untersuchungen umfaßten die Bestimmung des GSH-Gehalts und der Enzymaktivitäten von Glutathionreduktase (GR), Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH), 6-Phospho-Glukonatdehydrogenase (6-P-GDH) und Pyruvatkinase (PK) der Erythrozyten. Die Messungen wurden sowohl in der Gesamterythrozytenpopulation als auch in den durch Differentialzentrifugation gewonnenen drei Altersfraktionen vorgenommen.

Der GSH-Gehalt betrug bei den Normalpersonen in der Gesamtzellpopulation im Mittel 6,1±1,29 µM/gHb. Die nach Differentialzentrifugation jüngste Zellfraktion zeigte einen GSH-Wert von 6,19±1,55 µM/gHb, die mittlere Fraktion von 5,58±1,48 µM/gHb und die ältesten Zellen von 5,45±1,57 µM/gHb. Somit betrug der Abfall des GSH zwischen jüngster und ältester Zellfraktion im Mittel 11,9%. Für die GR betrugen die Werte in der Gesamtzellpopulation 4,32±0,96 IU/gHb, in der jüngsten Fraktion 4,97±1,3 IU/gHb, in der mittleren Schicht 4,11±1,23 IU/gHb und bei den ältesten Erythrozyten 3,81±1,21 IU/gHb. Die G-6PDH zeigte im Mittel folgende Aktivitäten: Gesamtzellsuspension 5,69±0,83 IU/gHb, jüngste Fraktion 6,38±1,22 IU/gHb, mittlere Fraktion 5,09±1,19 IU/gHb, älteste Fraktion 4,33±1,31 IU/gHb. Bei der 6-PGDH ergaben sich die Werte wie folgt: Gesamt-Erythrozyten-

Population 3,19±0,30 IU/gHb, jüngste Zellen 3,52±0,71 IU/gHb, mittlere Schicht 3,44±0,82 IU/gHb, älteste Zellen 2,91±0,68 IU/gHb. Die PK-Aktivitäten betrugen in der Gesamtsuspension 7,14±1,73 IU/gHb, in der jüngsten Fraktion 9,26±2,26 IU/gHb, in der mittleren Fraktion 7,02±231 IU/gHb und in der ältesten Fraktion 5,25±1,81 IU/gHb (Tabelle 1). Das bedeutet im einzelnen einen Gesamtaktivitätsverlust zwischen Fraktion I und III für die GR von 23,3%, für die G-6-PDH von 32,1%, für die 6-P-GDH von 17,3% und für die PK von 43,3%. Die Einzelwerte sind für alle Kollektive den Abbildungen 1-5 zu entnehmen.

Bei den Patienten mit chronischer Myelose wurden zwei Kollektive entsprechend dem GSH-Gehalt der Erythrozyten gebildet. Ein Kollektiv zeigte normale oder nur leicht erhöhte, das andere Kollektiv dagegen stark erhöhte Werte. Beide Gruppen wurden durch willkürliche Festlegung eines Grenzwertes von 8,5 uM/gHb gebildet.

Kollektiv CML I enthielt insgesamt 9 Untersuchungen bei 7 Patienten. Die klinischen Werte sind in Tabelle 4 zusammengefaßt, während die Mittelwerte von GSH und den gemessenen Enzymen aus Tabelle 1 und die prozentualen Veränderungen gegenüber dem Normalkollektiv aus Tabelle 3 hervorgehen. Dabei zeigte sich, daß bei Patienten, bei denen das GSH maximal um ein Drittel gegenüber der Norm erhöht war, keine eindeutige Korrelation zwischen Enzymaktivitäten und GSH-Gehalt bestand. Nur G-6-PDH und PK boten einen Aktivitätsanstieg im Vergleich mit dem Normalkollektiv. Dieser Anstieg fehlte bei der 6-P-GDH, während die GR-Aktivität sogar vermindert war.

Das Kollektiv CML II bestand aus 18 Untersuchungen an 13 Patienten. Die klinischen Werte sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die Mittelwerte für die Enzymaktivitäten gehen aus Tabelle 2, die prozentualen Abweichungen von den Normalwerten aus Tabelle 3 hervor. Die GSH-Werte bei diesen Patienten waren, abgesehen von der ältesten Fraktion, um mehr als 90% erhöht, und auch die Enzymaktivitäten zeigten mit Ausnahme der GR in der Gesamtzellpopulation und in der jüngsten Zellschicht eine Zunahme von 79,0 - 117,5%. Der Abfall des GSH-Gehalts bzw. der Enzymaktivitäten von der jüngsten zur ältesten Zellfraktion waren bei

diesem Patientenkollektiv deutlicher als bei CML I. So betrug die Abnahme von GSH 25% gegenüber 11,9% beim Normalkollektiv, bei der GR waren es 37,1% gegenüber 23,3%, bei der G-6-PDH 48,6% gegenüber 32,1%, bei der 6-G-GDH 37,7% gegenüber 17,3% und bei der PK 55,1% gegenüber 43,3%.

Die Gruppe der Patienten mit OMS/OMF umfaßte 11 Personen, an denen wir 14 Untersuchungen durchführten. Die klinischen Daten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt, die Mittelwerte für die Enzymaktivitäten sowie die prozentualen Veränderungen von GSH-Gehalt und Enzymaktivitäten gegenüber dem Normalkollektiv sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen. Alle Einzelwerte gehen - wie bei beiden anderen Krankengruppen - aus den Abbildungen 1-5 hervor. Gegenüber den Normalwerten sind die GSH-Werte bei den Patienten mit OMS/OMF um 45,9 bis 87,1% erhöht. Diese Erhöhung ist etwas geringer als beim Patientenkollektiv CML II. Bei der OMS/OMF waren die Enzymaktivitäten ungefähr im gleichen Ausmaß erhöht wie die GSH-Werte (Tabelle 3). Auch bei diesem Kollektiv war die Abanahme von GSH-Gehalt und Enzymaktivitäten wesentlich höher als bei den Normalpersonen. So betrug sie bei GSH 29,3% gegenüber 11,9%, bei der GR 32,1% gegenüber 23,3%, bei der G-6-PDH 51,8% gegenüber 32,1%, bei der 6-P-GDH 36,6% gegenüber 17,3% und bei der PK 57,4% gegenüber 43,3%. Bei vergleich der beiden Patientenkollektive OMS/OMF und CML II verhielten sich also GSH-Gehalt und Enzymaktivitäten der Erythrozyten sehr ähnlich.

		Normalkollektiv			Patienten-Kollektiv CML I		
GSH/ Enzym	F	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
GSH (µmol/ gHb)	G	12	6,10	1,29	3	6,38	0,64
	I	14	6,19	1,55	9	7,12	1,16
	II	14	5,58	1,48	9	7,47	1,02
	III	14	5,45	1,57	9	6,95	1,51
GR (IU/gHb)	G	12	4,32	0,96	3	3,05	0,81
	I	14	4,97	1,30	9	3,36	1,07
	II	14	4,11	1,23	9	3,38	0,79
	III	14	3,81	1,21	9	3,19	1,21
G-6-PDH (IU/gHb)	G	12	5,69	0,83	3	5,56	1,98
	I	14	6,38	1,22	9	7,82	1,64
	II	14	5,08	1,19	9	6,38	1,67
	III	14	4,33	1,31	9	4,83	1,30
6-P-GDH (IU/gHb)	G	12	3,19	0,30	3	2,84	0,49
	I	14	3,52	0,71	6	4,53	2,54
	II	14	3,44	0,82	6	3,44	0,59
	III	14	2,91	0,68	6	3,11	0,98
PK (IU/gHb)	G	11	7,14	1,73	3	10,38	1,96
	I	13	9,26	2,26	6	12,17	2,64
	II	13	7,02	2,31	6	9,12	1,71
	III	13	5,25	1,81	6	8,59	1,66

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen von GSH und Enzymaktivitäten von GR, G-6-PDH, 6-P-GDH und PK beim Normalkollektiv und Patienten-Kollektiv CML I

		Patienten-Kollektiv CML II			Patienten-Kollektiv OMS/OMF		
GSH/ Enzym	F	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
GSH (µmol/ gHb)	G	13	11,66	2,28	8	9,59	2,96
	I	18	11,92	2,21	14	11,24	1,60
	II	18	11,04	2,14	14	10,44	3,47
	III	18	8,94	2,73	14	7,95	2,20
GR (IU/gHb)	G	13	5,49	1,68	8	3,72	1,16
	I	18	6,06	2,30	14	4,34	1,30
	II	18	4,31	1,70	14	3,93	1,47
	III	18	3,81	1,24	14	3,15	1,17
G-6-PDH (IU/gHb)	G	12	10,33	3,16	8	8,79	2,85
	I	17	11,42	6,19	14	11,40	4,95
	II	17	6,81	2,51	14	8,57	2,84
	III	17	5,87	2,23	14	5,49	1,85
6-P-GDH (IU/gHb)	G	12	6,28	2,24	8	[illegible]	1,78
	I	12	6,92	2,78	10	6,09	2,22
	II	12	5,20	1,99	10	[illegible]	2,04
	III	12	4,31	2,20	10	3,86	1,10
PK (IU/gHb)	G	11	13,85	7,07	8	11,55	7,35
	I	11	20,14	13,11	10	15,46	10,17
	II	11	13,43	7,11	10	11,46	10,17
	III	11	9,09	4,01	10	6,59	4,35

TABELLE 2: Mittelwerte und Standardabweichungen von GSH und Enzymaktivitäten von GR, G-6-PDH, 6-P-GDH und PK beim Patientenkollektiv CML II und dem Patientenkollektiv OMS/OMF

Enzym	F	Patienten-Kollektiv CML I	Patienten-Kollektiv CML II	Patienten-Kollektiv OMS/OMF
GSH (µmol/gHb)	G	+ 4,6	+ 91,1	+ 57,2
	I	+ 15,0	+ 92,6	+ 81,9
	II	+ 33,8	+ 97,8	+ 87,1
	III	+ 27,5	+ 64,0	+ 45,9
GR (IU/gHb)	G	- 29,4	+ 27,1	- 13,9
	I	- 32,4	+ 21,9	- 12,7
	II	- 17,8	+ 4,9	- 11,9
	III	- 16,3	± 0	- 17,3
G-6-PDH (IU/gHb)	G	- 2,3	+ 81,5	+ 54,5
	I	+ 22,6	+ 79,0	+ 78,7
	II	+ 25,3	+ 33,8	+ 68,4
	III	+ 11,5	+ 35,6	+ 26,8
6-P-GDH (IU/gHb)	G	- 11,0	+ 96,9	+ 66,5
	I	+ 28,7	+ 96,6	+ 73,0
	II	± 0	+ 51,2	+ 57,3
	III	+ 6,9	+ 48,1	+ 32,6
PK (IU/gHb)	G	+ 45,4	+ 94,0	+ 61,8
	I	+ 31,4	+117,5	+ 67,0
	II	+ 29,9	+ 91,3	+ 63,2
	III	+ 63,6	+ 72,4	+ 25,5

TABELLE 3: Veränderungen der GSH- und Enzymmittelwerte bei den einzelnen Krankengruppen gegenüber den hämatologisch normalen Vergleichsgruppen in Prozent (%)

Nr.	Pat.	GSH (µmol/gHb) G	I	II	III	Hb g%	10^6 Erythrozyten pro mm^3	10^3 Leukozyten pro mm^3	% Blasten im Diff.-Blutbild	10^3 Thrombozyten pro mm^3	LDH IE/l
1.	J.B.	7,2	8,4	8,5	9,0	10,6	3,90	69,0	269	0	515
2.	M.E.	-	6,7	7,5	8,6	13,4	4,50	13,6	845	0	157
3.	M.E.	-	7,9	8,7	7,6	14,3	4,70	13,4	1125	0	153
4.	K.F.	-	5,4	5,8	5,2	15,1	5,45	15,3	578	0	174
5.	K.F.	6,0	5,7	5,9	5,9	15,4	6,09	15,7	350	1	172
6.	W.G.	-	7,8	7,5	7,7	14,9	4,71	12,8	228	0	175
7.	H.P.	-	7,6	7,2	6,0	12,6	4,23	11,7	564	1	186
8.	H.S.	-	8,4	8,0	4,8	11,3	4,27	266.	136	6,5	765
9.	U.T.	6,0	6,2	8,1	7,7	13,0	4,56	18,8	-	0	269

TABELLE 4: GSH-Gehalt und klinische Werte der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie bei normalen oder nur leicht erhöhten GSH-Werten (CML I)

Nr.	Pat.	GSH (umol/gHb) G	I	II	III	Hb g%	10^6 Erythrozyten pro mm^3		% Blasten im Diff.-Blutbild		LDH IE/l
							10^3 Leukozyten pro mm^3		10^3 Thrombozyten pro mm^3		
10.	H.B.	8,7	8,7	8,9	8,0	11,4	4,32	40,0	735	6	580
11.	I.B.	10,1	12,6	11,1	11,0	11,7	4,29	14,5	204	1	515
12.	W.F.	-	9,3	7,7	5,1	16,6	6,74	13,5	750	1	140
13.	H.H.	12,0	12,4	13,1	12,0	15,7	5,42	17,5	199	1	272
14.	E.H.	10,9	12,2	12,3	12,5	11,0	3,90	248.	530	4	403
15.	K.H.	11,9	14,5	14,8	12,7	9,8	3,91	26,6	354	0	956
16.	A.K.	11,4	14,7	9,6	7,0	7,2	-	362.	556	2	564
17.	A.K.	12,6	10,8	13,1	11,3	9,0	4,24	3,0	210	0	181
18.	A.K.	13,6	10,5	11,3	3,4	14,5	6,02	6,8	105	0	135
19.	A.Kr.	-	9,1	7,5	7,7	6,6	2,74	14,0	999	0	-
20.	A.L.	10,5	9,3	9,3	7,5	10,4	3,73	197.	138	2	793
21.	H.P.	10,9	12,7	9,8	9,5	13,5	4,95	16,4	380	0	233
22.	D.R.	-	14,9	10,3	9,9	13,3	4,25	-	177	5,5	623
23.	H.S.	-	10,2	13,1	8,3	14,6	4,56	102.	196	1,5	855
24.	H.S.	-	11,5	12,8	9,5	14,6	4,56	102.	196	1,5	855
25.	Ch.S.	13,3	12,7	14,0	12,5	8,7	3,48	17,0	310	11,5	569
26.	A.S.	8,7	12,1	10,1	7,2	9,6	3,58	4,8	24	3,0	-
27.	G.W.	17,5	16,4	10,2	6,0	8,3	-	99,0	546	1,0	891

TABELLE 5: GSH-Gehalt und klinische Werte der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie bei stark erhöhten GSH-Werten (CML II)

Nr.	Pat.	GSH (umol/gHb) G	I	II	III	Hb g%	10^6 Erythrozyten pro mm^3	10^3 Leukozyten pro mm^3	% Blasten im Diff.-Blutbild	10^3 Thrombozyten pro mm^3	LDH IE/l
28.	A.A.	-	8,6	7,9	8,4	11,0	3,82	5,0	290	0	200
29.	W.A.	-	9,2	8,2	7,7	-	-	-	-	-	-
30.	H.Be.	10,7	13,3	10,2	4,9	6,0	-	4,6	140	0	670
31.	H.Bo.	10,0	9,8	8,5	5,2	11,1	3,90	13,3	480	2	1286
32.	H.Bo.	15,3	12,1	9,4	8,7	9,9	3,73	7,9	218	4	1463
33.	B.	-	15,9	20,7	9,1	11,7	5,30	12,4	258	0	279
34.	F.	6,3	8,4	7,2	7,7	12,3	3,78	3,3	52	0	107
35.	H.G.	8,3	15,3	12,8	9,3	5,7	2,11	9,7	50	2	664
36.	H.G.	8,7	11,1	10,4	6,8	5,3	1,97	5,5	48	10	718
37.	H.G.	11,2	15,9	12,4	12,6	5,9	2,05	5,4	35	4	722
38.	M.M.	-	10,7	11,3	10,7	7,7	2,51	5,3	16	6	-
39.	A.S.	6,4	8,1	7,5	4,6	10,8	4,80	50,0	32	7	-
40.	G.S.	-	10,4	8,3	7,5	12,2	4,87	8,1	375	0	858
41.	S.	-	8,7	11,4	8,2	9,1	3,40	3,2	19	0	110

TABELLE 6: GSH-Gehalt und klinische Werte der Patienten mit Osteomyelosklerose bzw. Osteomyelofibrose (OMS/OMF)

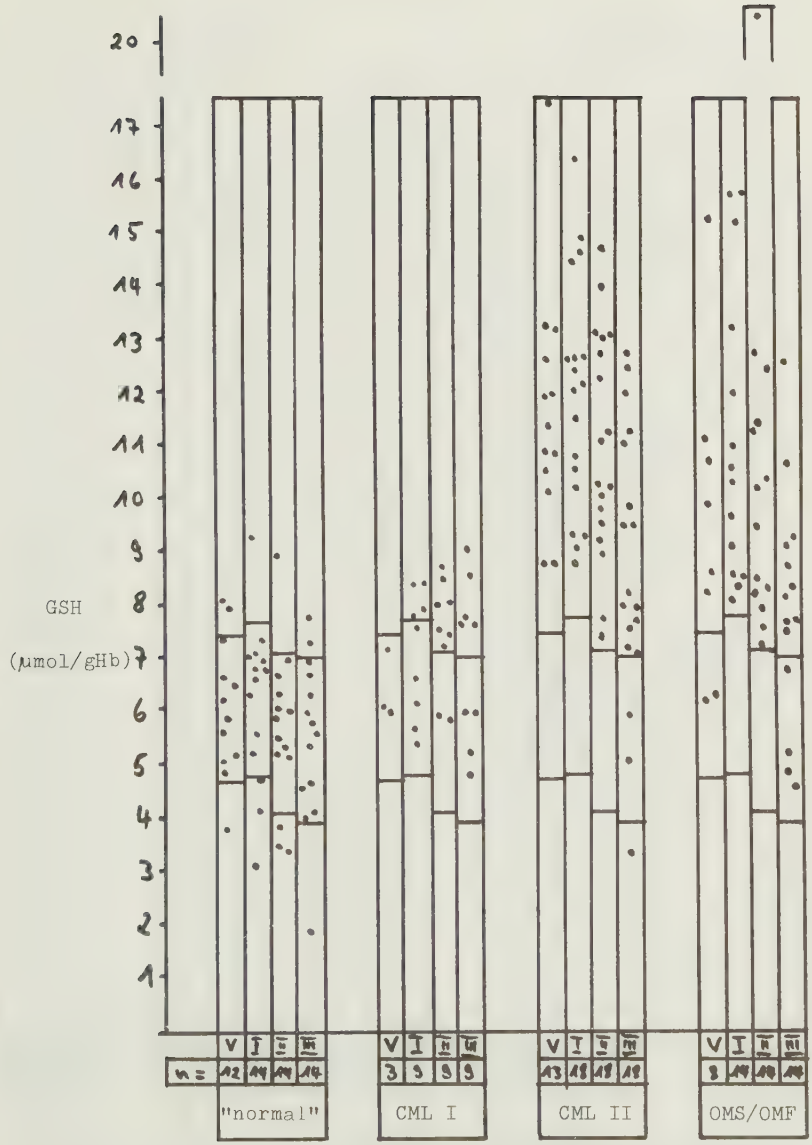


Abbildung 1: Glutathiongehalt im Vollblut sowie in den Altersfraktionen der Erythrozyten von Normalpersonen sowie Patienten mit CML und OMS/OMF

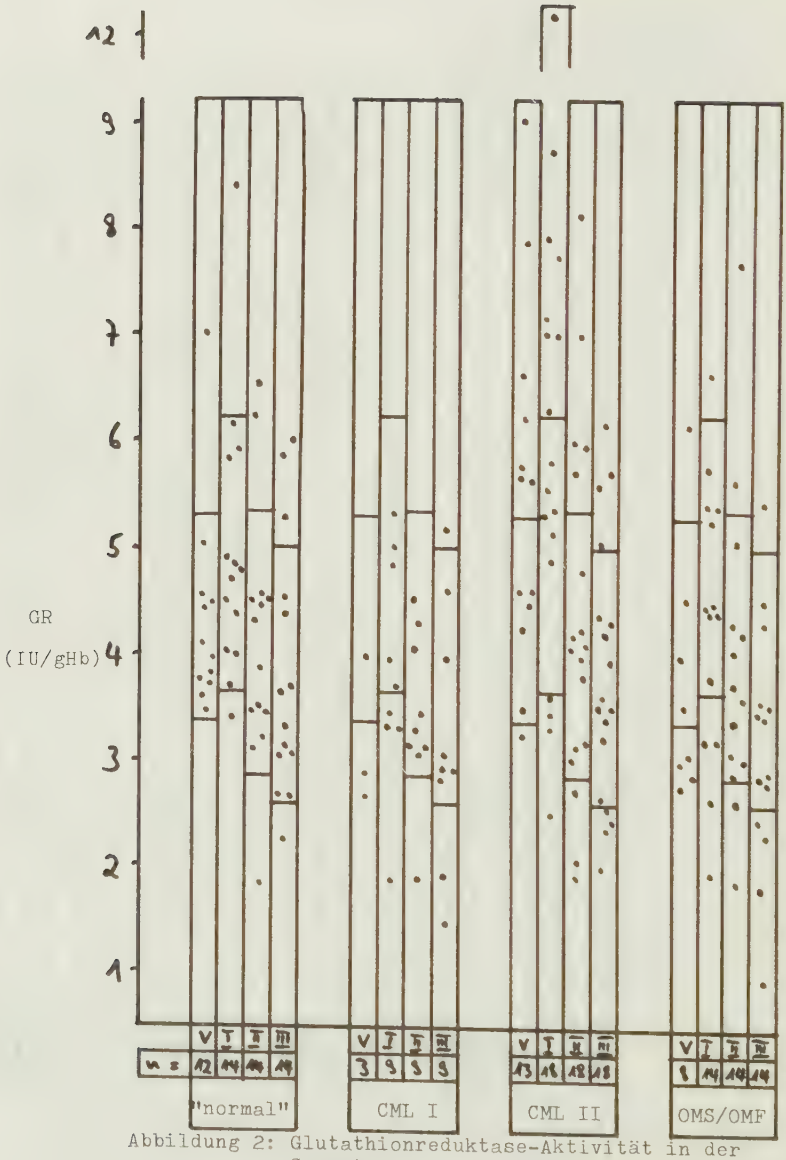


Abbildung 2: Glutathionreduktase-Aktivität in der Gesamtpopulation sowie in den einzelnen Altersfraktionen der Erythrozyten von Normalpersonen sowie Patienten mit CML und OMS/OMF

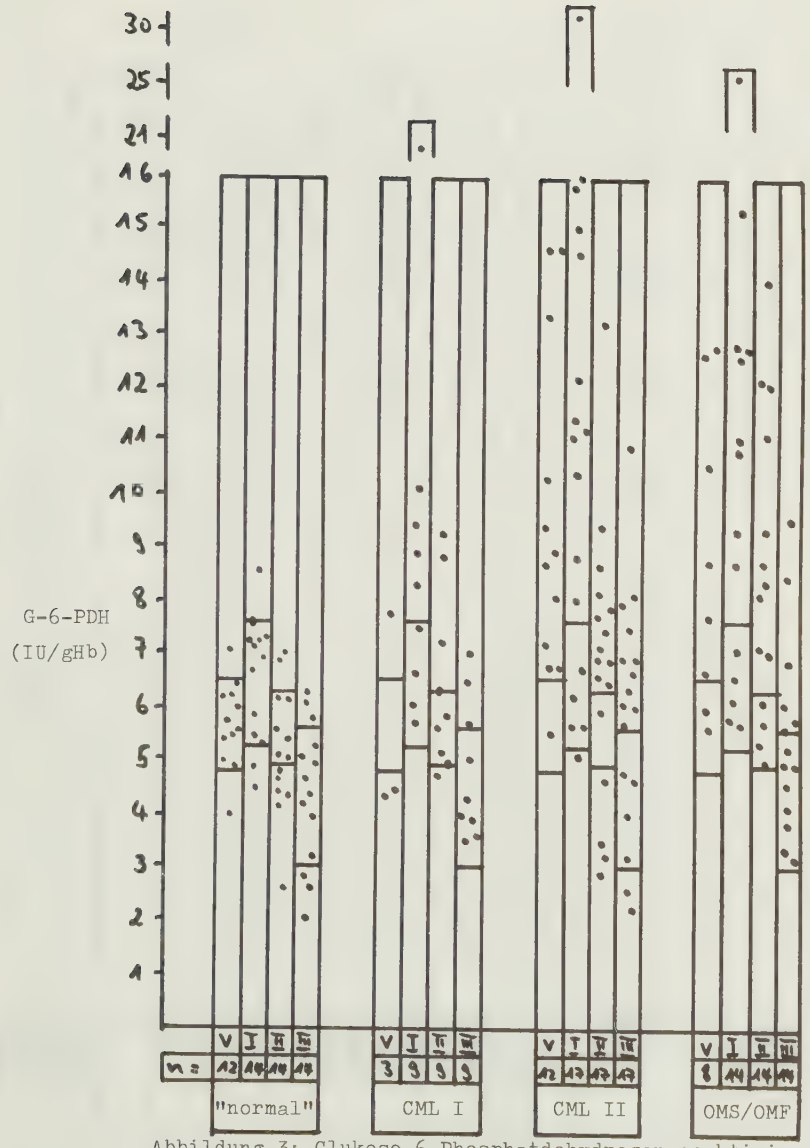


Abbildung 3: Glukose-6-Phosphatdehydrogenaseaktivität in der Gesamtpopulation sowie in den Altersfraktionen der Erythrozyten von Normalpersonen sowie Patienten mit CML und OMS/OMF

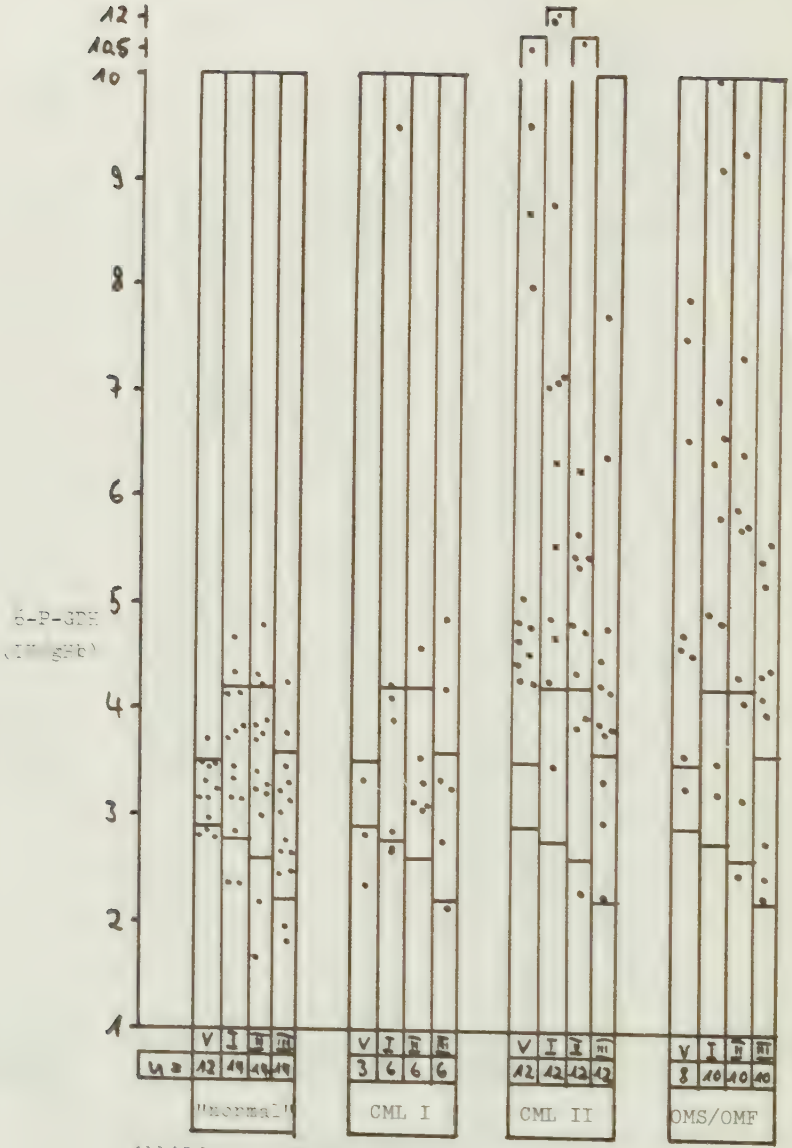


Abbildung 4: 6-Phospho-Glukonatdehydrogenaseaktivität in der Gesamtpopulation sowie in den Altersfraktionen der Erythrozyten von Normalpersonen sowie Patienten mit CML und OMS/OMF

Abbildung 5: Pyruvatkinase-Aktivität in der Gesamtpopulation in den Altersfraktionen der Erythrozyten von Normalpersonen sowie Patienten mit CML und OMS/OMF

DISKUSSION

Die Auftrennung von Erythrozyten verschiedenen Alters ist sowohl durch in vivo als auch in vitro Methoden möglich. Die in vivo Methoden bedienen sich hämolysierender Substanzen wie Phenylhydrazin oder Primaquin, die zur beschleunigten Ausschüttung von jungen Erythrozyten aus dem Knochenmark führen (48,84). Der Vorteil dieser Methode ist die fehlende mechanische Beanspruchung der Zellen während ihrer Gewinnung. Dieses Verfahren besitzt allerdings mehrere Nachteile: a.) Die übermäßige Stimulation durch die Hämolyse auf das Knochenmark kann zur Ausschüttung minderwertiger Zellen mit verkürzter Lebenszeit führen. (33,64). b.) Nur direkt im Anschluß an die Gabe der hämolysierenden Substanzen erhält man eine homogene Fraktion junger Erythrozyten. Später treten zunehmend gemischte Erythrozytenpopulationen auf. c.) Dieses Verfahren ist nur im Tierexperiment anwendbar.
Die in vitro Methoden zur Gewinnung verschiedener Altersfraktionen von Erythrozyten basieren auf drei Prinzipien:
a.) Differentialagglutination intravital gealteter Erythrozyten mit Hilfe von A_1-spezifischen Phythämagglutininen (55,89).
b.) Differentialhämolyse mit hypotonen Salzlösungen (NaCl, KCl), die auf der unterschiedlichen osmotischen Resistenz alternder Zellen beruht (59,76).
c.) Differentialzentrifugation, die sich der unterschiedlichen Dichte alternder Zellen bedient (25,51,55,60,71,72,94).
Ein weiteres Verfahren kombiniert die beiden letztgenannten Methoden unter Verwendung hypotoner Albuminlösungen (25).
Wegen der leichten Anwendbarkeit und der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind heute nur noch die Dichtezentrifugationsverfahren in diskontinuierlichen Gradienten gebräuchlich. Zur Verwendung kommen dabei isotonische NaCl- und KCl-Lösungen (60), Albuminlösungen (51,71) sowie Dextran und Polyäthylen-Glykole (94), Phtalatester und Silikone (25,26). Wir verwendeten für unsere Untersuchungen Albumingradienten, da nach den Erfahrungen von PIOMELLI et al. (71) und LEIF/VINOGRAD (51) diese Substanzen die Eigenschaften der Erythrozyten am wenigsten verändern.
Der Begriff myeloproliferatives Syndrom wurde 1951 von DAMESCHEK

geprägt (24). Darunter versteht man eine Gruppe von Erkrankungen die gekennzeichnet sind durch Störungen der Zellproliferation im Knochenmark und einem Rückschlag der Blutbildung in Organe, die während der Embryonalzeit blutbildende Funktionen besitzen. Zu den Erkrankungen dieses Formenkreises zählt man die Polyzythämia vera, die chronische myeloische Leukämie, die Osteomyelo-(fibro)sklerose, die essentielle Thrombozytose und die Erythroleukosen (24). Im weiteren Sinne wird auch die akute myeloische Leukämie dazugezählt (4). Für dieses Syndrom ist kennzeichnend, daß die verschiedenen Erkrankungen ineinander übergehen können. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden nur Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie und Osteomyelo(fibro)sklerose ausgewählt. Bei beiden Erkrankungen werden häufig Anämien verschiedener Genese gefunden. In der Mehrzahl der Fälle mit Osteomyelo(fibro)sklerose wurde eine Verkürzung der Erythrozyten-Lebensdauer nachgewiesen (3,35,86). Die Anämie bei dieser Erkrankung entsteht meist durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren:

a.) durch Reduktion der Blutzellneubildung infolge Markfibrose;
b.) durch eine ineffektive Erythropoese (19,34,66,67,82,86,), die durch eine vorzeitige und beschleunigte Zerstörung von Erythrozytenvorstufen wie Erythroblasten und Normoblasten im Knochenmark charakterisiert ist; c.) durch eine verkürzte Lebensdauer der in der Peripherie befindlichen Erythrozyten (20,47,67, 82).

Zum Teil kann die Anämie auch durch eine Verdünnung des Blutes im Rahmen einer plasmareichen Hypervolämie verstärkt erscheinen (41).

Bei Fällen mit exzessiv vergrößerter Milz kann eine gesteigerte und verlängerte Erythrozytenstagnation in der Milz für die Entstehung der Anämie eine ausschlaggebende Rolle spielen (23).

Die bei der chronisch myeloischen Leukämie gefundene Anämie beruht meist auf einer Verdrängung durch die erheblich gesteigerte Myelopoese. Eine sehr stark vergrößerte Milz kann wie bei der Osteomyelo(fibro)sklerose zu einer Verstärkung der Anämie beitragen.

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit Literaturangaben, daß in Erythrozyten von Normalpersonen mit zu-

nehmendem Zellalter GSH-Gehalt, G-6-PDH, 6-P-GDH und PK-Aktivitäten abfallen (54,55,89). Die prozentuale Abnahme betrug bei unseren Versuchen von der jüngsten zur ältesten Zellfraktion für diese Enzyme zwischen 17,3% und 43,3%. Im Gegensatz zu den Befunden von BIRKE (14) zeigte bei uns die GR einen altersabhängigen Aktivitätsverlust von etwa 20%. Im Normalkollektiv lagen unsere GSH-Werte im Gesamtblut im Mittel bei 6,10 µmol/gHb. Vergleichsweise fand BLUME (15) im Mittel 6,14 µmol/gHb, während BIRKE (14) einen Mittelwert von 10,0 µmol/gHb in der jüngsten Fraktion und von 9,23 µmol/gHb in der mittleren Fraktion angab. Rechnet man unsere auf gHb bezogenen GSH-Werte auf die bisher gebräuchlichen Parameter Erythrozytenzahl (normal: 21,0±3,6 umol/10^{11}Ery) oder Hämatokritwert (normal: 2,45±0,3 mmol/l gepackte Erys) um, so ergibt sich eine sehr gute Korrelation. Vergleicht man unsere G-6-PDH-Aktivitäten mit denen der zuletzt genannten Arbeit, so stimmen sie weitgehend überein.

Unsere Untersuchungen an 21 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie ergaben kein einheitliches Verhalten der GSH-Werte der Erythrozyten. Die zeigten eine Streuung zwischen 6,0 und 17,4 µmol/gHb in der Gesamterythrozyten-Suspension. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit BENÖHR (10,11), BLUME (15), GOSWITZ (36) und SABINE (77). Wir haben Patienten mit CML willkürlich anhand der GSH-Werte in zwei Gruppen unterteilt, wobei ein Grenzwert von 8,5 µmol/gHb festgelegt wurde. Dabei fiel auf, daß bei den Patienten mit stark erhöhten GSH-Werten das Ausmaß des Abfalls von GSH-Gehalt und Enzymaktivitäten deutlich stärker war als beim Normalkollektiv bzw. bei den Patienten mit CML und nur leicht erhöhten GSH-Werten. Entsprechend der Erhöhung der GSH-Werte in den Patientenkollektiven CML I und CML II fanden wir - wenn auch graduell verschieden - gleichzeitig eine Erhöhung der Aktivitäten von G-6-PDH, 6-P-GDH und PK.

GOSWITZ et al. (36) beobachteten bei ihren Patienten einen vom Grad der Anämie abhängigen Anstieg der GSH-Werte. Aufgrund unserer eigenen Befunde läßt sich keine eindeutige Korrelation mit den Hb- und Erythrozyten-Werten im peripheren Blut feststellen. Auch zu allen anderen von uns ermittelten Untersuchungsparametern wie Lebergröße, Milzgröße, Hämoglobingehalt, Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Differentialblutbild, Retiku-

lozyten, Laktatdehydrogenase im Serum, alkalischer Leukozytenphosphatase, Philadelphia-Chromosom, Sternalpunktat, Beckenkammstanze und spezifischer Therapie ergab sich keine Beziehung. Aus Gründen der besseren Übersiche wurden nur die Befunde des Blutbildes und die Laktatdehydrogenaseaktivitäten im Serum in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

Gegenüber den Patienten mit CML fanden wir bei Patienten mit Osteomyelo(fibro)sklerose durchweg eine Erhöhung der GSH-Werte und Enzymaktivitäten. Die steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BENÖHR (10,11), GOSWITZ (36), HENNEMANN (39) und SCHRÖTER (81). Bei zwei Patienten waren die GSH-Werte in der Gesamterythrozytenpopulation zwar normal, nach Auftrennung ergaben sich in den beiden Fraktionen mit jungen Zellen jedoch einmal (Nr. 35) stark erhöhte, im anderen Fall (Nr. 34) leicht erhöhte GSH-Werte. Auch bei diesem Patientenkollektiv beobachteten wir - wie bei der Gruppe CML II- neben der Zunahme der Enzymaktivitäten von G-6-PDH, 6-P-GDH und PK eine Erhöhung der GSH-Werte. Tabelle 6 zeigt eindeutig, daß bei den Patienten mit OMS/OMF - wie schon bei denen mit CML - keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen GSH-Erhöhung und den von uns erhobenen klinischen Parametern bestehen. Bezüglich der Anämie steht dies im Widerspruch zu den von GOSWITZ (36) gemachten Angaben, die eine Relation zwischen GSH-Erhöhung und Ausmaß der Anämie fanden.

Bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wurden erhöhte GSH-Werte in den Erythrozyten gefunden (10,11,15,36,68,77,81, 87). Die Ursache dieser erhöhten GSH-Werte ist bis heute nicht bekannt. Als Möglichkeiten werden diskutiert:

1. Anämiefolge
2. funktionell veränderte, aus sekundären Blutbildungszentren stammende Erythrozyten
3. Steigerung der Glutathion-Synthetase-Aktivität
4. junge Erythrozytenpopulationen.

Aufgrund der Befunde von GOSWITZ (36) waren die höchsten GSH-Werte bei Patienten mit schwersten Anämien zu beobachten. Aufgrund von Stoffwechseluntersuchungen ist bekannt, daß bei Patienten mit Anämien der 2,3-Diphosphoglyzerat- und ATP-Gehalt der Erythrozyten durchweg erhöht ist (69). Durch den erhöhten

2,3-Diphosphoglyzeratgehalt ist die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins erhöht (29). Im Hinblick auf das GSH ist ein ähnlicher regulativer Zusammenhang mit Stoffwechselprozessen in der Zelle denkbar. Das erhöhte Redoxpotential, das infolge des erhöhten GSH-Gehalts der Zellen wahrscheinlich ist, könnte bei Anämien einen besseren Schutz der Erythrozyten gegen oxydative Einflüsse darstellen. Unsere Befunde lassen eine sichere Korrelation zwischen Erhöhung der GSH und Anämie nicht erkennen. Wir fanden z.T. besonders stark erhöhte GSH-Werte bei Patienten (Nr. 13,18,22) ohne Anämie. Weitere Untersuchungen ergaben zusätzlich, daß zwischen den Änderungen von 2,3-Diphosphoglyzerat-, ATP- und GSH-Gehalt der Erythrozyten keine Korrelation besteht (8).
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß der GSH-Gehalt im Verlaufe der Zellalterung abnimmt. Bei Anämien infolge Hämolyse oder Blutung, die durch einen wesentlich höheren Anteil an jungen Erythrozyten im peripheren Blut gekennzeichnet sind, wurden in den jüngsten Zellfraktionen neben Enzymaktivitätssteigerungen auch erhöhte GSH-Werte gefunden (39). Wenn man jedoch die von uns gemessenen Enzymaktivitäten in den Kollektiven CML II und OMS/OMF zugrunde legt, die für das Vorhandensein einer wesentlich jüngeren Zellpopulation sprechen können, so ist die GSH-Konzentration vergleichsweise wesentlich überhöht. Man muß also einen zusätzlichen Mechanismus für das Zustandekommen der GSH-Erhöhung bei CML und OMS/OMF annehmen (3).
Eine veränderte Erythrozytenpopulation bei den von uns untersuchten Erkrankungen ist im Zusammenhang mit der Sklerosierung bzw. Fibrosierung des Knochenmarks denkbar. GRALNICK et al. (37) stellten bei ca. 25% der Fälle mit CML eine begleitende Markfibrose zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ohne vorher durchgeführte Therapie fest. Legt man diese Befunde zugrunde, ist der Zusammenhang von überhöhten GSH-Werten mit der Osteomyelo(fibro)-sklerose zu diskutieren. Tatsächlich ist dies jedoch nicht wahrscheinlich, da Patienten mit hohem GSH keineswegs immer eine zusätzliche Markfibrose aufweisen.
Ein anderer Grund für die überhöhten GSH-Werte könnte eine ineffektive Erythropoese sein, die bei Patienten mit OMS/OMF (19, 86) aber auch bei Patienten mit Thalassämie, aplastischer Anämie und paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie nachgewiesen wurde.

Vor allem bei Patienten mit diesen Erkrankungen wurden zum Teil deutlich überhöhte GSH-Werte gemessen (9,14). Bei dem von uns ausgewählten Krankengut wurden keine Untersuchungen zum Nachweis bzw. Ausschluß einer ineffektiven Erythropoese durchgeführt, sodaß wir zur Frage einer möglichen Beziehung mit der GSH-Erhöhung keine Stellung nehmen können.
Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die hohen GSH-Werte ist - wie bereits angedeutet - daß es sich um veränderte Erythrozyten aus sekundären Blutbildungszentren handelt (36). Um diese Hypothese zu untermauern, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation eine Aufgliederung der Erythrozyten in verschiedene Altersklassen durchgeführt. Dabei wurden unter Vergleich mit einem Normalkollektiv die Änderungen von Enzymaktivitäten und GSH-Gehalt mit der Alterung der Zellen untersucht. Aus den von uns gewonnenen Ergebnissen läßt sich jedoch keine eindeutige Antwort ableiten. Da bei aplastischen Anämien ebenfalls exzessiv erhöhte GSH-Konzentrationen der Erythrozyten gefunden werden, muß die Ursache wohl vor allem in Veränderungen des Knochenmark gesucht werden.

BLUME (15) beschrieb als Ursache erhöhter GSH-Werte eine Aktivitätssteigerung der GSH-Synthetase. Hingegen ließen sich aus seinen Ergebnissen an Hand von Enzymaktivitätsbestimmungen der G-6-PDH und GOT keine Hinweise für eine verjüngte Zellpopulation gewinnen. Dieser Befund bedarf der Überprüfung.

Faßt man unsere Befunde und die Ergebnisse anderer Autoren zusammen, so läßt sich bei vielen Patienten mit CML und OMS/OMF eine verjüngte Erythrozytenpopulation im peripheren Blut feststellen. Neben der Enzymaktivitäts-Erhöhung in den Erythrozyten dieser Patienten besteht z.T. ein stark überhöhter GSH-Gehalt, der bis heute keine befriedigende Erklärung gefunden hat. Eine Korrelation zwischen der Erhöhung des GSH-Gehalts der Erythrozyten und dem Schweregrad der klinischen und hämatologischen Veränderungen und der Prognose des Krankheitsverlaufes läßt sich nicht aufzeigen.

ZUSAMMENFASSUNG

1.) Erythrozytensuspensionen wurden durch Albumindichte-Gradientenzentrifugation in drei Fraktionen verschiedenen Alters aufgetrennt. In diesen Fraktionen wurden der GSH-Gehalt und die Enzymaktivitäten von GR, G-6-PDH, 6-P-GDH und PK bestimmt. Wir führten 28 Untersuchungen an 21 Patienten mit CML, 14 Untersuchungen an 11 Patienten mit OMS/OMF und 14 Untersuchungen an 14 hämatologisch normalen Probanden durch.

2.) Der GSH-Gehalt betrug beim Normalkollektiv im Mittel 6,1 µmol/gHb, bei den Fällen mit OMS/OMF 9,59 µmol/gHb. Die Fälle mit CML wurden anhand der GSH-Werte in zwei Kollektive (CML I, CML II) unterteilt, deren Mittelwerte 6,38 und 11,66 µmol/gHb betrugen.

3.) Während der GSH-Abfall zwischen der jüngsten und der ältesten Zellfraktion im Normalkollektiv etwa 12% betrug, lagen diese Werte für CML I bei 2,9%, für CML II bei 25% und für OMS/OMF bei 29,3%.

4.) Gegenüber den Normalpersonen fanden wir bei den Kollektiven CML II und OMS/OMF deutlich gesteigerte Aktivitäten bei G-6-PDH, 6-P-GDH und PK. Eine wesentliche Veränderung der GR-Aktivitäten wurde nicht beobachtet.

5.) Einen besonders starken Abfall der Enzymaktivitäten der G-6-PDH und PK zwischen jüngster und ältester Fraktion fanden wir bei den Patientenkollektiven CML II und OMS/OMF.

6.) Gemessen an Erythrozytensuspensionen mit verjüngten Zellpopulationen wie bei Sphärozytose und Blutungsanämien war der GSH-Gehalt der Patientenkollektive CML II und OMS/OMF stark überhöht.

7.) Eine eindeutige Korrelation unserer Untersuchungsergebnisse zu den klinischen Daten unter besonderer Berücksichtigung der GSH-Werte konnte nicht gefunden werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1 ALLEN, D.W. and JANDL, J.H.: Oxydative hemolysis and precipitation of hemoglobin II. Role of thiols in oxidant drug action. J. Clin. Invest. 40, 454-475 (1961)

2 BARRON, E.S.G.: Thiol groups of biological importance Advanc. Enzymol. 11, 201-266 (1951)

3 BARTOS, H., DESFORGES, J.F. and MOLONEY, W.C.: Red cell enzymes in the anemia of myelofibrosis. Ann. Int. Med. 68, 533-538 (1968)

4 BEGEMANN, H.: Osteomyelosklerose bzw. Osteomyelofibrose. in: Klinische Hämatologie p. 491-499 2. Auflage Stuttgart: Thieme 1975

5 BEISENHERZ, G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, Th., CZOK, K.H., GARBADE, K.H., MEYER-ARENDT, E. und PFLEIDERER, G.: Diphospho-Frukto-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 86, 555-577 (1953)

6 BENESCH, R.E. and BENESCH, R.: Relation between erythrocyte integrity and sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 48, 38-42 (1954)

7 BENÖHR, H. Chr.: Störungen im Glutathionstoffwechsel und deren Bedeutung für die Entstehung hämolytischer Anämien. Habilitationsschrift, Tübingen 1971

8 BENÖHR, H. Chr.: pers. Mitteilung vom 27.11.1975

9 BENÖHR, H. Chr.: pers. Mitteilung vom 2.12.1975

10 BENÖHR, H. Chr. und WALLER, H.D.: GSH-Gehalt in Erythrozyten bei chronisch myeloischer Leukämie, Osteomyelosklerose und Panmyelopathie. in: Leukämie p. 257-259 Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972 Editors: Gross, R. and van de Loo, J.

11 BENÖHR, H. Chr., TIGGES, F.J. und WALLER, H.D.: Reduziertes Glutathion (GSH) in Erythrozyten bei myeloproliferativen Erkrankungen. Vhdlg. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 461-463 (1973)

12 BERNSTEIN, R.E.: Alteration in metabolic ergergetics and cation transport during aging of red cells. J. Clin. Invest. 38, 1572-1586 (1959)

13 BEUTLER, E., DURON, O. and KELLY, B.M.: Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med. 61, 882-891 (1963)

14 BIRKE, B.: Glutathiongehalt und Aktivität glutathionreduzierender Enzyme in Erythrozyten in Abhängigkeit vom Zellalter. Dissertationsschrift, Tübingen 1973

15 BLUME, K.G., PANIKER, N.V. and BEUTLER, E.: Enzymes of glutathione synthesis in patients with myeloproliferative disorders. Clin. Chim. Acta, 45, 281-285 (1973)

16 BONSIGNORE, A., FORNAINI, G., FANTONI, A., LEONCINI, G. and SEGNI, P.: Relationship between age and enzymatic activities in human erythrocytes from normal and fava-bean-sensitive subjects. J. Clin. Invest. 43, 834-841 (1964)

17 BREWER, G.J. and POWELL, R.D.: Hexokinase activity as a function of age of the human erythrocyte. Nature 199, 704-705 (1963)

18 BREWER, G.J., TARLOV, A.R., KELLERMEYER, R.W. and ALVING, A.S.: The hemolytic effect of primaquine. XV. Role of methemoglobin. J. Lab. Clin. Med. 59, 905-917 (1962)

19 BRUNNER, H.E.: Die Osteomyelofibrose; Untersuchung der Ferro- und Erythrozytenkinetik mit readioaktivem Eisen und Chrom. Acta Haematol. 34, 257-276 (1965)

20 BRUNNER, H.E. und FRICK, P.G.: Untersuchungen der Erythrozytenkinetik mit Chrome-51 und Eisen-59 bei Osteomyelofibrose. Schweiz. Med. Wschr. 92, 1309-1311 (1962)

21 BUSCH, D.: Die Biochemie des Erythrozyten, mit Ausnahme des Hämoglobins. in: Handbuch Innere Medizin 5. Auflage, 2.Band, 1.Teil, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1968

22 BUSCH, D. und PELZ, K.: Erythrozytenisolierung an Blut mit Baumwolle. Klin. Wschr. 44, 983-984 (1966)

23 CHRISTENSEN, B.E.: Red cell kinetics in Polycythemia and Myelofibrosis. Clin. Haematol. 4, 393-405 (1975)

24 DAMESHEK, W.: Some speculations on the myeloproliferative syndroms. Blood 6, 372-375 (1951)

25 DANON, A., and MARIKOWSKY, Y.: Determination of density distribution of red cell population. J. Lab. Clin. Med. 64, 668-674 (1964)

26 DANON, A., MARIKOWSKY, Y., FUREDI, A. and OHAD, I.: On the separation of old from young erythrocytes in hypotonic bovine serum albumin solutions. Biochim. Biophys. Acta 104, 281-284 (1965)

27 DANON, A., SHEBA, C. and RAMOT, B.: The morphologie of glucose-6-phosphat dehydrogenase deficient erythrocytes. Electron microscopic studies. Blood 17, 229-234 (1961)

28 DRABKIN, D.L. and AUSTIN, J.H.: Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. J. Biol. Chem. 112, 51-65 (1965)

29 EDWARDS, M.J., KOLER, R.D., RIGAS, D.A. and PITCAIRN, D.M.: The effect of the in vivo aging of normal human erythrocytes and erythrocyte macromolecules upon oxyhemoglobin dissociation. J. Clin. Invest. 40, 636-642 (1961)

30 EGGSTEIN, M.: Über Erythrozytenlipide beim Menschen. Zyto- und Histochemie in der Hämatologie. in: 9. Freiburger Symposium, Berlin, Springer 1962

31 FLOHE, L. und GÜNZLER, W.A.: Glutathione peroxydase. in: Glutathione, p. 132-145, Stuttgart, Thieme 1974 Editors: Flohe, L., Benöhr, H.Chr., Sies, H. Waller, H.D. und Wendel, A.

32 FLOHE', L. und ZIMMERMANN, R.: GSH-induced high-amplitude swelling of mitochondria. in: Glutathione, p. 245-260, Stuttgart, Thieme 1974, Edits: Flohe, L., Benohr, H.Chr., Sies, H., Waller, H.D., und Wendel, A.

33 FORNAINI, G.: Biochemical modifications during the life span of the erythrocyte. Ital. J. Biochem. 16, 257-330 (1967)

34 FRISCHAUF, H., HONETZ, N. und KEIBL, E.: Weitere Untersuchungen zur Frage der Erythrozytenkinetik bei Blutkrankheiten. Wien. Klin. Wschr. 78, 777-783 (1966)

35 GELINSKY, P. und MÜLLER, D.: Die Anämie bei Osteomyelosklerse. Vergleich zwischen hämatologischen und erythrokinetischen Untersuchungen. Klin. Wschr. 50, 21-32 (1972)

36 GOSWITZ, F., LEE, G.R., CARTWRIGHT, G.E. and WINTROBE, M.M.: Erythrocyte reduced glutathione, glucose-6-phosphat dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase in patients with myelofibrosis. J. Lab. Clin. Med. 67, 615-623 (1966)

37 GRALNICK, H.R., HARBOR, J. and VOGEL, C.: Myelofibrosis in chronic granulocytic leukemia. Blood 37, 152-162 (1971)

38 GRIGNANI, F. und LÖHR, G.W.: Über die Hexokinase in menschlichen Blutzellen. Klin. Wschr. 38, 796-799 (1960)

39 HENNEMANN, H.H.: Increased glucose-6-phosphat dehydrogenase activity in erythrocytes and its clinical significance. Klin. Wschr. 41, 1014-1018 (1963)

40 HORECKER, B.L. and SMYRNIOTIS, P.Z.: 6-phosphogluconic dehydrogenase. in: Method in enzymology I p. 323-327 (Edits. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) New York, Acad. Press 1955

41 HUBER, H., LEWIS, S.M. und SZUR, L.: Zur Frage der Verdünnungsanämien und der Blutvolumenänderungen bei verschiedenen Anämieformen. Med. Klin. 60, 668-672 (1965)

42 HUISHMAN, T.H.J. and DOZY, A.M.: Studies on the heterogenity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxydized glutathione. J. Lab. Clin. Med. 60, 302-319 (1962)

43 HUISHMAN, T.H.J., DOZY, A.M., HORTON, B.F. and NECHTMAN, C.M.: Studies on the heterogenity of hemoglobin. X. The nature of various minor hemoglobin components produced in human red blood cell hemolysates on aging. J. Lab. Clin. Med. 67, 355-373 (1966)

44 HUISTERKAMP, D. and EBAUGH, F.G.jun.: Site of attachment of the chromate ion to the hemoglobin molecule. Nature 193, 1253-1255 (1962)

45 ISHERWOOD, F.A.: Chemistry and biochemistry of glutathione. in: Glutathione Biochem. Symp. p. 3-16 (Edit: Crook, E.M.) Cambridge, Univ. Press 1959

46 JACOB, H.S. and JANDL, J.H.: Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of hemolysis. J. Clin. Invest. 41, 779-792 (1962)

47 KEESE-ELIAS, M., GYFRAKI, E., ALEVIZON-TERZAKI, V. and MALAMOS, B.: Fe-59 and Cr-51 studies in aplastic anaemia and myelofibrosis

48 KELLERMEYER, R.W., TARLOV, A.R., BREWER, G.J., CARSON, P.E. and ALVING, A.S.: Hemolytic effect of therapeutic drugs. J. Am. Med. Ass. 180, 388-394 (1962)

49 KOSOWER, N.S. and KOSOWER, E.M.: Protection of membranes by glutathione. in: Glutathione p. 216-227 (Edits.: Flohe, L., Benöhr, H.Chr., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A.) Stuttgart, Thieme 1974

50 KOSOWER, N.S. and KOSOWER, E.M.: Effect of G-S-S-G on protein synthesis. in: Glutathione p. 276-286 (Edits.: Flohe, L., Benöhr, H.Chr., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A.) Stuttgart, Thieme 1974

51 LEIF, R.C. and VINOGRAD, J.: The distribution of buoyant density of human erythrocytes in bovin albumin solutions. Proc. Nat. Acad. Sc. 51, 520-528 (1964)

52 LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Zellstoffwechsel und Zellalterung Klin. Wschr. 37, 833-843 (1959)

53 LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (Zwischenferment). in: Methoden der enzymatischen Analyse (Edit.: Bergmeyer, H.K.) Weinheim/Bergstraße, Chemie-Verlag 1962 a

54 LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Zur Biochemie der Erythrozytenalterung Folia Haemat. 78, 385-402 (1962a)

55 LÖHR, G.W., WALLER, H.D., KARGES, O., SCHLEGEL, B., und MÜLLER, A.A.: Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrozyten. Klin. Wschr. 36, 1008-1013 (1958)

56 LONDON, I.M.: The metabolism of erythrocyte. Harvey Lecture, Academic Press, New York 1961

57 MAC DOUGALL, L.G., JUDISCH, J.M. and MISTRY, S.B.: Red cell metabolism in iron deficiency anaemia. II. The relationship between red cell survival and alterations in red cell metabolism. J. Ped. 76, 660-675 (1970)

58 MANN, P. J.G.: The reduction of glutathione by a liver system. Biochem. J. 26, 785-790 (1932)

59 MARKS, P.A. and JOHNSON, A.B.: Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance. A basis for separating young and old erythrocytes. J. Clin. Invest. 37, 1542-1548 (1958)

60 MARKS, P.A. and GROSS, R.T. : Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Evidence of differences between negroes and caucasians with respect to this genetically determined trait. J. Clin. Invest. 38, 2253-2262 (1959)

61 MARKS, P.A., JOHNSON, A.B., HIRSCHBERG, E. and BANKS, J.: Studies on the mechanisms of aging of human red blood cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 95-105 (1958)

62 MEISTER, A.: Biosynthesis and utilisation of glutathion: the γ-glutamyl-cycle and its function in amino acid transport. in: Glutathione p. 56-68 (Edits.: Flohe, L., Benöhr, H.Chr., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A.) Stuttgart, Thieme 1974

63 MELDRUN, N.U.: The reduction of glutathione in mammalian erythrocytes. Biochem. J. 26, 817-828 (1932)

64 MELLETT, F.R. and GLOWACKI, E.R.: In vivo maturation of immature reticulocytes transfused into a normal rabbit. Nature 204, 1207-1209 (1964)

65 NAKAO, M., NAKAO, T., YAMAZOE, S. and YOSHIKAWA, H.: Adenosin triphosphate and shape of erythrocyte. J. Biochem 49, 487-492 (1962)

66 NATHAN, D.G. and BERLIN, N.J.: Studies of the production of erythrocytes in myeloid metaplasia. Blood 14, 668-682 (1959)

67 OETTGEN, H.F. und PRIBILLA, W.: Die Erythrokinetik bei Osteomyelofibrose (Untersuchungen über die Produktion und Destruktion der Erythrozyten mit Cr-51 und Fe-59). Klin Wschr. 42, 483-490 (1964)

68 ÖZSOYLU, S.: Glutathione concentration and stability of red blood cells in acute childhood leukemia. Acta Haematol. 44, 233-239 (1970)

69 OSKI, F.A. and BOTTLIEB, A.J.: The interrelationships between red blood cell metabolites, hemoglobin and the oxygen-equilibrium curve. Prog. Hematol. VII., 33-67 (1971)

70 PIERIE, N.W. and PINKEY, K.G.: The titration curve of glutathione. J. Biol. Chem. 84, 321-333 (1929)

71 PIOMELLI, S., LURINSKI, G. and WASSERMANN, L.R.: The mechanism of red cell aging. I. Relationship between cell age and specific gravity evaluated by ultracentrifugation in a discontinous density gradient. J. Lab. Clin. Med. 69, 659-673 (1967)

72 PRANKERD, T.A.J.: The aging of red cells. J. Physiol. 325-331 (1958)

73 PRANKERD, T.A.J.: Chemical and physical changes in the aging red cell. Folia Haemat. 78, 382-383 (1962)

74 RACKER, E.: Glutathione as a coenzyme in intermediary metabolism. in: Glutathion (Edits.: Colowick, S.P.: p. 165-183, New York, Acad. Press 1954

75 RAPOPORT, S.: Reifungs- und Alterungsvorgänge in Erythrozyten. Folia Haemat. 78 364-381 (1962)

76 RIGAS, D.A. and KOLER, R.D.: Ultracentrifugal fractionation of human erythrocytes on the basis of cell age. J. Lab. Clin. Med. 58, 242-246 (1961)

77 SABINE, J.C.: Glutathione concentration and stability in the red blood cell in varous disease states, and some observations on action of acetylphenylhydrazine. Brit. J. Haemat. 10, 477-484 (1964)

78 SCHEUCH, D. und RAPOPORT, S.: Intrazelluläre Regulation der Aktivität einiger SH-Enzyme durch Glutathion. Folia Haemat. 78, 349-355 (1962)

79 SCHEUCH, D. und WAGENKNECHT, C.: Über die Bedeutung des Glutathion für den Stoffwechsel intakter Zellen am Beispiel der roten Blutkörperchen. Acta biol. med. germ. Suppl. II 199-204 (1962)

80 SCHLEGEL, B. und BÖTTNER, H.: Innere Krankheiten und Lebensdauer transfundierter Erythrozyten. Vhdlg. Dtsch. Ges. Inn. Med. 58, 732-735 (1962)

81 SCHRÖTER, W., SCHULZ, E. und BONN, R.: Die Bedeutung der Glutathionkonzentration der Erythrozyten für die Diagnose der Osteomyelofibrose. Klin Wschr. 48, 1013 (1970)

82 SCHULZ, K., NOWOTNY, P., BAST, G., PREUSSNER, S., KONRAD, H. und LIENCKE, H.: Vergleichende Untersuchungen zur Erythrozytenkinetik und zur Knochenmarksmorphologie bei Patienten mit Osteomyelosklerose und Osteomyelofibrose. Acta Haemat. 43, 280-290 (1970)

83 SRIVASTAVA, S.K. and BEUTLER, E.: The transport of oxydized glutathione from human erythrocytes. J. Biol. Chem. 244, 9-16 (1969)

84 STRUMIA, M.M.: X. Erythrokinetics. in: The red blood cell. p. 18-22 (Edits.: Bishop, P. and Surgenor, D.M.) 1.Edition, New York, Acad. Press 1964

85 SYLLEN-RAPOPORT, I., STRASSBURGER, I. und RAPOPORT, S.: Glycoluxe von Erythrozyten bei Mangnesiummangel. Folia Haemat. 78, 474-476 (1962)

86 SZUR, L. and LEWIS, S.M.: Iron kinetics in polycythaemia and myelofibrosis. Lin. Haematol. 4, 407-425 (1975)

87 THEIL, G.B., BRODINE, C.E. and DOOLAN, P.D.: Red cell glutathione content and stability in renal insufficiency. J. Lab. Clin Med. 58, 736-742 (1961)

88 WALLER, H.D.: Beziehung zwischen Zellstoffwechsel und Zellalterung. Habilitationsschrift, Marburg 1960

89 WALLER, H.D.: Biochemical determinations of red cell life span. in: Haemoglobin and red cell production and destruction. 2,p. 34-52, Copenhagen, Munksgaard 1965

90 WALLER, H.D.: Reinigung der Erythrozyten-Glutathion-Reduktase von Gesunden und Patienten mit Glutathion-Reduktasemangel. Klin. Wschr. 45, 827-823 (1967)

91 WALLER, H.D. und LÖHR, G.W.: Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Heinzkörperbildung in Erythrozyten. Folia Haemat. 80, 360-376 (1963)

92 WALLER, H.D., SCHLEGEL, B., MÜLLER, A.A. und LÖHR, G.W.: Der Hämoglobingehalt in alternden Erythrozyten. Klin. Wschr. 37, 898-900 (1959)

93 WALLER, H.D., BENÖHR, H. Chr., HEUER, B. und NERKE, O.: Die Glutathionreduktion in Erythrozyten von Gesunden und Enzymmangelträgern. Klin. Wschr. 48, 79-85 (1970)

94 WALTER, H., SELBY, F.W. and GARZA, R.: On the countercurrent distribution of red blood cells: an addendum. Biochim. Biophys. Acta 136 , 148-150 (1967)

95 WENDEL, A.: Biosynthesis of glutathione in red blood cells. in: Glutathione, p. 69-78 (Edits.: Flohe, L., Benöhr, H.Chr., Sies, H., Waller, H.D. und Wendel, A.) Stuttgart, Thieme 1974

Herrn Professor Dr. H. Chr. Benöhr danke ich für die Überlassung des Themas sowie ganz besonders dafür, daß er jederzeit zur Verfügung stand, um anstehende Probleme zu klären, und das er immer in einer so herzlichen Atmosphäre tat, daß die Arbeit an dieser Dissertation nie unangenehm wurde.
Herrn Professor Dr.H.D. Waller danke ich für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor sowie Herrn Dr. F.-J. Tigges dafür, daß er mir besonders bei kniffligen Fragen oft durch sehr nützliche Tips half. Auch Frau M. Castrillon und Frau A. Wodausch gilt mein Dank, denn sie gaben mir viele praktische Hilfen während des experimentellen Arbeitens und schufen ein angenehmes Arbeitsklima im Labor.
Vergessen werden soll auch nicht der Dank an alle Personen, ob krank oder gesund, die durch die großzügige Bereitstellung ihres Blutes diese Arbeit erst ermöglichten.

LEBENSLAUF

Als Sohn des Arztes Dr. med. Werner Kraft und seiner Frau Christel geb. Stietzel wurde ich, Rudolf Kraft, am 26.7.1951 in Groß-Ottersleben geboren. Vom Frühjahr 1958 ab besuchte ich die Grundschule und vom Frühjahr 1962 bis 1970 den altsprachlichen Zweig des Wilhelm von Oranien-Gymnasium in Dillenburg, wo ich am 20.6.1970 mein Abitur bestand.
Zum Wintersemester 1970/71 schrieb ich mich an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen im Fach Humanmedizin ein, legte am 27.9.1971 hier die wissenschaftliche Vorprüfung ab, bestand am 2.4.1973 das Physikum und am 9.7.1976 mein medizinisches Staatsexamen in Tübingen.